

EFFECTOS DEL ACIDO HIALURONICO, EN DISTINTAS CONCENTRACIONES Y PESOS MOLECULARES, SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE LOS EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS IN VITRO

Ghaffarilaleh^{1,3}, V., Ghafari², F., Paramio³, M.T. y Fouladi-Nashta¹, A.A

¹Reproduction Genes and Development group, Royal Veterinary College, Hawkshead Campus, Hatfield AL9 7TA, UK. ²Centre for Reproductive medicine, Walsgrave University Hospital, Coventry, CV2 2DX, UK. ³Departamento de Ciencia Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, España.
teresa.paramio@uab.es

INTRODUCCIÓN

El ácido Hialurónico (HA) es un carbohidrato con largas cadenas de polímeros de azúcares que se encuentra en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos animales (Hay, 1991). El HA presenta diferentes compuestos según su peso molecular. Así el HA de alto peso molecular ($> 1000-5000$ disacáridos y un peso molecular de 5×10^6 Da) llamado Healon es un componente estructural de los tejidos y tiene un papel en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Underhill et al., 1989). El HA de alto peso molecular se encuentra durante la ovulación, la fecundación y la embriogénesis. El HA de medio peso molecular ($500 - 750 \times 10^3$ Da) llamado hylovet y el de bajo peso molecular (55×10^3 Da) llamado hyal2 son estimulantes angiogénicos y del sistema inflamatorio e inmune (Stern et al., 2006). Las funciones fisiológicas del HA dependen de su concentración y de su peso molecular. Dattena et al. (2006) demostraron en ovino que la adición de HA al medio de cultivo embrionario incrementó la tasa de gestación de estos embriones producidos *in vitro*. El objetivo del presente estudio es comprobar el efecto de distintos pesos moleculares del HA añadido en distintas concentraciones al medio de cultivo embrionario sobre la tasa de supervivencia de los blastocistos obtenidos después de la congelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios fueron recogidos de un matadero comercial a 1 hora del laboratorio. Los oocitos se obtuvieron por aspiración de los folículos de 2-6 mm de diámetro. Una vez liberados de los folículos, los oocitos se lavaron dos veces y se maduraron en medio TCM199 suplementado con $10 \mu\text{g/ml}$ FSH (Follitropin, Bioniche animal health, Belleville, ON, Canada), $10 \mu\text{g/ml}$ de LH (Leutropin, Bioniche animal health, Belleville, ON, Canada), Epidermal Growth Factor 10 ng/ml , 17β -estradiol $1 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$ gentamycin, 6 mg/ml BSA fraction V y cisteamina. Grupos de 40-50 oocitos fueron madurados en $500 \mu\text{l}$ del medio de maduración durante 25 horas a $38,5^\circ\text{C}$ en una atmósfera del 5% de CO_2 saturado de humedad. Se utilizó semen congelado de 1 macho. Los espermatozoides se seleccionaron por *swim-up* y se inseminaron con 1×10^6 de espermatozoides en el medio de fecundación enriquecido con 15% de suero de oveja en celo. Después de 20 horas de co-cultivo de los gametos en el medio de fecundación, los presuntos cigotos, se lavaron y se transfirieron a las gotas del medio de cultivo. Los cigotos se cultivaron en SOF (Fluido Oviductal Sintético) con BSA (Albumina Serica Bovina). A las 48 h post-fecundación, los oocitos divididos en 2-4 células se cultivaron en SOF a los que se añadió el tratamiento experimental: a) Healon en concentraciones de 0,125, 0,25 and 0,5 mg/ml, b) hyalovet en concentraciones 0,25, 0,50 and 1 mg/ml y c) hyal2 en concentraciones de 75, 150 and 300 UI/ml. Después de 7 días de cultivo, los blastocistos obtenidos fueron vitrificados según la técnica de Vajta *et al* (1998). Brevemente, la técnica consiste en utilizar el TCM199 con 20% de SFB (Suero Fetal Bovino) como medio base (MB) de congelación. Los blastocistos se colocaron en MB durante 7 minutos, posteriormente se transfirieron a MB con 7,5% de EG (Etilenglicol) (v / v) y 7,5% de DMSO (Dimetil Sulfóxido) (v / v) durante 3 minutos y después a MB con 16,5% de EG y 16,5% de DMSO por 25 segundos. Inmediatamente los embriones se colocan en pajuelas y se sumergen en N_2 líquido. Una vez descongelados los blastocistos fueron cultivados durante 48 horas en medio SOF con BSA para observar su supervivencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en la Figura 1. Estos resultados indican que el HA a diferentes pesos moleculares y concentraciones mejoran la supervivencia embrionaria después de la descongelación. Los embriones producidos *in vitro* presentan baja tolerancia comparados a la congelación comparados con los producidos *in vivo* (Rizos et al., 2003).. La adición de healon no mejoraba significativamente la supervivencia embrionaria, sin embargo la adición de 1 mg/ml de hyalovet (1mg/ml) y de 75 UI/ml de hyal2 aumentaban significativamente la tasa de supervivencia comparados con el control. Stojkovic et al (1999) demostraron que los embriones cultivados con HA presentaban menos anormalidades estructurales (formación de blastocelas, orgánulos en el citoplasma, microvellosidades, diferenciación del botón embrionario) después de la congelación/descongelación que los embriones no tratados. También se ha observado este efecto beneficioso en ovocitos (Marquant- Le Guienn et al.,1999) y embriones bovinos (Furnus et al., 1998) y porcinos (Miyoshi et al., 1999).En conclusión el Ácido Hialurónico puede ser un aditivo interesante en los medios de cultivo de embriones para mejorar su supervivencia después de la congelación, especialmente para los embriones producidos *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Dattena M, Mara L, Bin T AA, Cappai P. 2007. Molecular Reproduction and Development.74:42-47. • Furnus CC, de Matos DG, Martinez AG. 1998. Theriogenology.49:1489-1499. • Hay ED. 1991. New York: Plenum Press. • Marquant-Le Guienne B, Guyader-Joly C, Ponchon S, Delalleau N, Humblot P. 1999.Theriogenology. 51:386. • Miyoshi K, Umezu M, Sato E. 1999. Theriogenology. 51:777-784. • Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003. Biology of Reproduction. 68:236-243. • Stern R, Asari AA, Sugahara KN. 2006. European Journal of Cell Biology. 85:699-715. • Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson J, et al. 2002. Reproduction. 124:141-153. • Underhill CB. 1989. The Biology of Hyaluronan. 87-106. • Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. 1998. Molecular Reproduction and Development. 51:53-58..

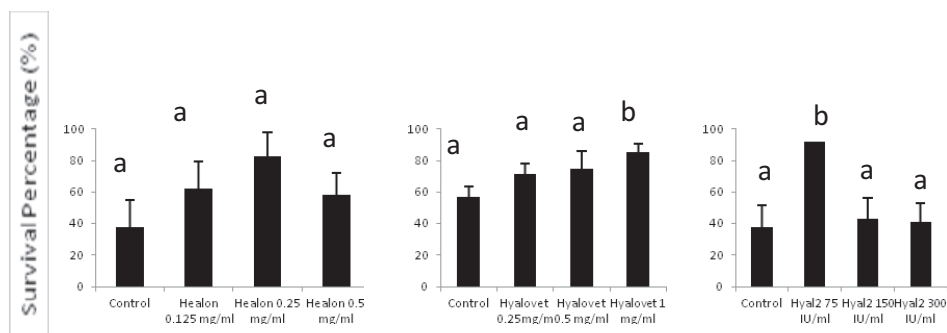


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de Acido Hialurónico de distintos pesos moleculares (Healon: alto peso molecular; Hyalovet: medio peso molecular y Hyal2: bajo peso molecular) sobre la supervivencia de los blastocistos ovinos producidos in vitro después de la descongelación. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas

EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS AND MOLECULAR WEITH OF HYALURONIC ACID ON SURVIVAL OF IN VITRO SHEEP EMBRYOS AFTER CRYOPRESERVATION

ABSTRACT: Hyaluronic Acid (HA), a component of extracellular matrix in mammalian tissues including that of the reproductive system, has been shown to support embryo survival. HA is produced in various sizes with distinct physiological functions. In vitro produced 4 + cell stage embryos were cultured in serum free synthetic oviduct fluid with different concentrations of different sizes HA without (control) or supplemented with three increasing concentrations of healon (molecular weight 5×10^6 Da, 0.125, 0.25 and 0.5 mg/ml), hyalovet (molecular weight $500 - 750 \times 10^3$ Da, 0.25, 0.50 and 1 mg/ml) and hyal2 (molecular weight 55×10^3 Da, 75, 150 and 300 IU/ml). Blastocysts from each treatment/repeat were vitrified in open pulled straws. Thereafter, thawed embryos cultured for an extra period of 48 h to analyse their survival rate. SPSS version 20 software was used for analyzing the data with generalized linear model. HA in large size numerically increased survival rates 48 h after culture in serum free media (38 ± 17.1 , 63 ± 17.1 , 83 ± 15.2 and 58 ± 14.2 ; $P > 0.05$), but medium size (57 ± 6.45 , 71 ± 6.45 , 75 ± 10.83 and 85 ± 5.00 , $P \leq 0.05$), and small size (38 ± 13.5 , 92 ± 7.04 , 43 ± 13.2 and 41 ± 11.9 , $P \leq 0.05$) improved the survival rate. In conclusion HA has ability to improve the viability of frozen blastocysts after freezing.

Keywords: Hyaluronan, ovine, blastocyst, cryopreservation